

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ мРНК *FOXP3* В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ БОЛЬНЫХ РАКОМ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННОЙ ГИПЕРПЛАЗИЕЙ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

О.А. Коровин^{1,2*}, А.В. Алясова², Д.В. Новиков⁴, Х. Ариуа³, Н.В. Красногорова^{1,3}, В.В. Новиков^{3,4}

¹ ГБУЗ НО «Городская больница № 33», Нижний Новгород

² ФГБОУ ВПО «Приволжский исследовательский медицинский университет», Нижний Новгород

³ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород

⁴ ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной», Нижний Новгород

ASSESSMENT OF mRNA *FOXP3* LEVELS IN TUMOR TISSUE OF PATIENTS WITH PROSTATE CANCER AND BENIGN PROSTATE HYPERPLASIA

O.A. Korovin^{1,2*}, A.V. Alyasova², D.V. Novikov⁴, Kh. Ariua³, N.V. Krasnogorova^{1,3}, V.V. Novikov^{3,4}

¹ Clinical City Hospital No 33, Nizhny Novgorod, Russia

² Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

³ Lobachevsky Nizhny Novgorod National State Research University, Nizhny Novgorod, Russia

⁴ Blokhin Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia

* E-mail: dok.kor1177@mail.ru

Аннотация

На сегодняшний день регистрируется неуклонный рост случаев обнаружения опухолей предстательной железы. Одним из маркеров опухолевой ткани является *FOXP3*. **Цель исследования** – оценка уровня мРНК *FOXP3* в опухолевых очагах больных раком и доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) при разном течении опухолевого процесса. **Материалы и методы.** В исследование были включены 63 пациента с раком предстательной железы (РПЖ) и 52 пациента с ДГПЖ. Определение относительного уровня мРНК *FOXP3* проводили методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции в реальном времени. **Результаты.** Частота обнаружения мРНК *FOXP3* в опухолях больных с РПЖ составила 78.0%, с ДГПЖ – 88.4%. У пациентов с РПЖ, имеющих объем предстательной железы более 50 см³, уровень мРНК *FOXP3* был в 2.66 раза ниже, чем у лиц, имевших объем органа до 25 см³ (p = 0.008). У больных ДГПЖ с объемом органа до 25 см³ уровень мРНК *FOXP3* был выше в 5.73 раза, чем у больных с объемом простаты более 50 см³ (p = 0.05). У больных ДГПЖ с содержанием тестостерона в крови от 15 ммоль/л и выше уровень мРНК *FOXP3* в опухоли был в 2.64 раза больше по сравнению с пациентами с уровнем гормона от 5 до 15 ммоль/л (p = 0.0305). Наличие метастазов в регионарных лимфоузлах при РПЖ сопровождалось снижением уровня мРНК *FOXP3* в три раза (p = 0.0049) по сравнению с альтернативной группой. **Заключение.** Уровень мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани предстательной железы ассоциирован с уровнем тестостерона и объемом предстательной железы. Результаты свидетельствуют о потенциальной применимости данного показателя в качестве мониторингового иммунологического маркера при РПЖ и ДГПЖ.

Ключевые слова: мРНК *FOXP3*, обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция в реальном времени, рак предстательной железы, доброкачественная гиперплазия предстательной железы.

Abstract

To date, a steady increase in detecting prostate tumors has been recorded. One of the markers of tumor tissue is *FOXP3*. **Purpose.** To assess *FOXP3* mRNA levels in tumor foci of patients with cancer and benign prostatic hyperplasia with different courses of tumor process. **Materials and methods.** 63 patients with prostate cancer (PC) and 52 patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) were enrolled in the study. Relative *FOXP3* mRNA levels were determined by the reverse transcription – polymerase chain reaction in real time. Results. The frequency of *FOXP3* mRNA detection in tumors of patients with prostate cancer was 78.0%, with BPH – 88.4%. *FOXP3* mRNA level in PC patients with prostate gland volume more than 50 cm³ was 2.5 times lower, if to compare to PC patients with organ volume up to 25 cm³ (p = 0.008). In BPH patients with organ volume up to 25 cm³, *FOXP3* mRNA level was 5.73 times higher than in patients with prostate volume more than 50 cm³ (p = 0.0500). In BPH patients with blood testosterone levels 15 mmol/l and higher, *FOXP3* mRNA level in tumor was 2.64 times higher than in patients with hormone levels from 5 to 15 mmol/l (p = 0.0305). If PC patients had metastases in their regional lymph nodes, *FOXP3* mRNA level was 3.0 folds less (p = 0.0049), than in patients from the alternative group. **Conclusion.** *FOXP3* mRNA level in prostate tumor tissue is associated with testosterone levels and prostate volume. The obtained results demonstrate the effectiveness of the studied parameter as an immunological marker for monitoring PC and BPH.

Keywords: mRNA *FOXP3*, reverse transcription polymerase chain reaction in real time, prostate cancer, benign prostatic hyperplasia.

Ссылка для цитирования: Коровин О.А., Алясова А.В., Новиков Д.В., Ариуа Х., Красногорова Н.В., Новиков В.В. Определение уровня мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани больных раком и доброкачественной гиперплазией предстательной железы. *Кремлевская медицина. Клинический вестник.* 2023; 4: 37–41.

Экспрессия белка *FOXP3*, кодируемого геном *FOXP3*, выявляется в различных нормальных тканях, например в молочной железе, печени, легких, простате, селезенке, гипофизе, яичках и тимусе, что предполагает широкие биологические и физиологические функции *FOXP3* [1]. Кроме того, белок *FOXP3* был обнаружен в клетках рака молочной железы, предстательной железы, немелкоклеточного рака легкого, гепатоцеллюлярной карциномы [1–3] и некоторых других опухолей. Имеются данные о взаимосвязи уровня его продукции с различиями в клинических исходах заболевания у больных некоторыми солидными опухолями [2].

Эффекты супрессии иммунного ответа при опухолевом росте могут быть частично обусловлены инфильтрацией новообразований регуляторными Т-клетками (Treg), которые принимают участие в подавлении иммунных реакций (регулируют Т-клеточный гомеостаз, предотвращают аутоиммунные заболевания, аллергии, гиперчувствительность, реакцию «трансплантат против хозяина», но при этом снижают иммунитет к инфекциям). Представлены данные, указывающие, что *FOXP3* регулирует развитие и функции Treg, вызывая клонирование опухоли от действия иммунокомпетентных клеток вследствие дисбаланса иммуноредукции и иммунного ответа [4]. Напротив, по мнению других авторов, экспрессия *FOXP3* в линиях раковых клеток человека ингибирует рост опухоли, в том числе рак предстательной железы. Следует отметить, что не все *FOXP3*⁺ опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ТИЛ) являются Treg, поскольку активация Т-клеточного рецептора Т-клеток может индуцировать временную экспрессию *FOXP3* без супрессивных свойств [5]. Ранее на транскрипционном уровне не проводилось детального изучения экспрессии гена *FOXP3* в опухолях больных раком и доброкачественной гиперплазией предстательной железы.

Цель исследования – оценка уровня мРНК *FOXP3* в опухолевых очагах больных раком и доброкачественной гиперплазией предстательной железы в зависимости от ряда факторов, характеризующих течение опухолевого процесса.

Материалы и методы

Исследованы образцы опухолевой ткани 63 пациентов с раком предстательной железы (РПЖ) и 52 пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ), проходивших лечение в ГБУЗ НО «Городская больница № 33» г. Нижнего Новгорода. Возраст обследованных больных варьировал от 57 до 83 лет (медиана – 73.2±1.5 года). Исследование было проведено согласно этическим принципам, установленным Хельсинкской декларацией [принятой в июне 1964 г. (Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2013 г. (Форталеза,

Бразилия)], и Федеральному закону от 05.07.1996 № 86-ФЗ (ред. от 19.07.2011) «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности». От каждого участника получено информированное согласие на включение в исследование.

Количественное определение общего простатспецифического антигена (ПСА) и уровня тестостерона в сыворотке крови проводили иммуноферментным методом с помощью коммерческих тест-систем. Большинство больных РПЖ имели уровень ПСА до операции более 10 нг/мл (33/63–52.4%), уровень тестостерона 5–15 нг/мл (51/63–81.0%), объем предстательной железы составлял 25–50 см³ (34/63–54.0%). Поражения регионарных лимфоузлов имели место у 11/63 (17.5%). У больных ДГПЖ уровень ПСА до операции составил преимущественно до 4 нг/мл (37/52–71.2%), уровень тестостерона 5–15 ммоль/л (36/52–69.2%), объем простаты – более 50 см³ (25/52–48.1%).

После хирургического удаления тканей фрагмент опухолевого очага размером 0.5 см³ помещали в 0.5 мл лизирующего буфера (4М гуанидин тиоцианат, 100 мМ цитрат натрия и 0.1%-й Triton X-100) и хранили при -20°C до использования. Выделение суммарной фракции нуклеиновых кислот проводили методом, предложенным в работе P. Chomczynski и N. Sacchi [6]. Полученный препарат нуклеиновой кислоты обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific Inc., США) и синтезировали кДНК с использованием M-MLV ревертазы (ЗАО «Силекс», Россия). Уровни мРНК рассчитывали по формуле $\Delta\Delta Ct$ с учетом эффективности реакции, как ранее было предложено M.W. Pfaffl и соавт. [7]. Нормировку уровня мРНК в опухолях проводили относительно уровня мРНК убиквитина С (*UBC*). Определение уровней мРНК исследуемого гена и гена домашнего хозяйства проводили в одной пробирке с использованием зондов TaqMan. Смесь ПЦР объемом 25 мкл содержала 2 мкл кДНК, по 0.4 пМ праймеров и зондов TaqMan, 0.8 мМ дНТФ, 2 мМ MgCl₂, 2.5 единицы активности Taq-полимеразы (ЗАО «Силекс», Россия). Реакцию проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) по методике, разработанной соавторами статьи [8].

Полученную кДНК амплифицировали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с использованием амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США) по программе: 94 °C – 10 мин, 50 циклов ПЦР 94 °C – 30 сек, 55 °C – 30 сек, 72 °C – 30 сек. Первичная структура используемых праймеров и зондов представлена в табл. 1.

Статистическую обработку данных и построение рисунков выполняли с помощью компьютерных программ Statistica, версия 8.0 (StatSoft Inc., США) и GraphPad Prism,

Таблица 1

Первичная структура праймеров и зондов, использованных для определения уровней мРНК *FOXP3* и убиквитина С

Ген	Олигонуклеотид	Первичная структура (5'→3')
<i>FOXP3</i>	<i>FOXP3 F</i>	GAGAAGCTGAGTGCCATGCA
	<i>FOXP3 R</i>	GGAGCCCTTGTCGGATGAT
	<i>FOXP3 Z</i>	FAM-TGCCATTTTCCCAGCCAGGTGG-BHQ-1
<i>UBC</i>	<i>UBC F</i>	GCACAGCTAGTTCCGTCGCA
	<i>UBC R</i>	GAAGATCTGCATTGTCAAGT
	<i>UBC Z</i>	Cy5-ATTTGGGTCGCAGTTCTTGTGGAT-RTQ-2

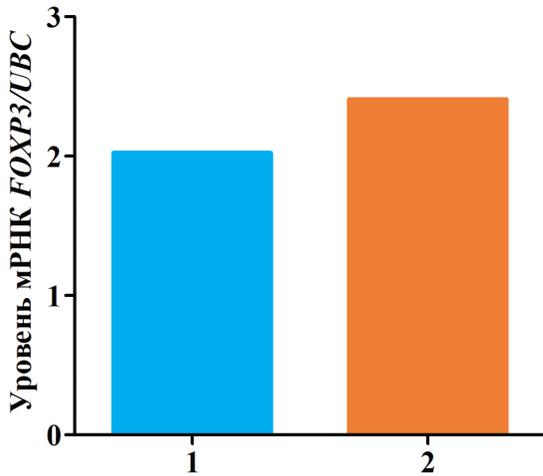
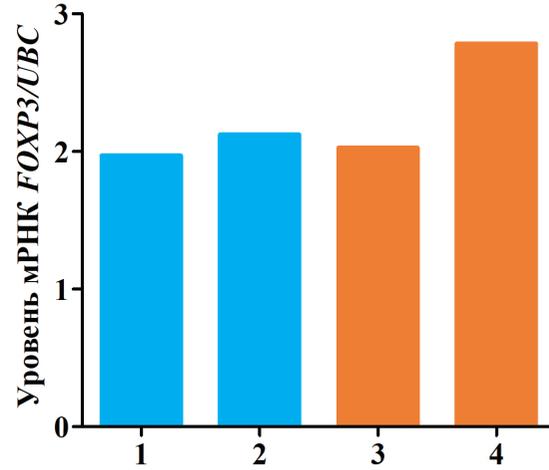
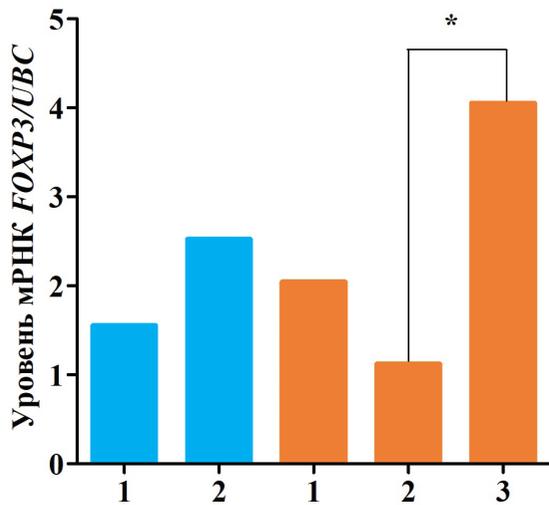


Рис. 1. Содержание мРНК FOXP3 в опухолевой ткани больных раком, N = 63 (1), и доброкачественной гиперплазией предстательной железы, N = 52 (2)



■ Больные раком предстательной железы
■ Больные доброкачественной гиперплазией предстательной железы

Примечание. 1 – больные с уровнем ПСА 4–10 нг/мл, 2 – больные с уровнем ПСА более 10 нг/мл, 3 – больные с уровнем ПСА до 4 нг/мл, 4 – больные с уровнем ПСА 4–10 нг/мл



■ Больные раком предстательной железы
■ Больные доброкачественной гиперплазией предстательной железы

Примечание. 1 – уровень тестостерона до 5 ммоль/л, 2 – уровень тестостерона 5–15 ммоль/л, 3 – уровень тестостерона больше 15 ммоль/л.

* Статистически значимое различие между больными доброкачественной гиперплазией предстательной железы с уровнем тестостерона от 5 до 15 ммоль/л и больше 15 ммоль/л ($p = 0.0305$).

Рис. 2. Содержание мРНК FOXP3 в опухолевой ткани больных с разным уровнем тестостерона в крови

версия 5.0 (GraphPad Software Inc., США). Для сравнения двух независимых групп по количественным признакам применяли двусторонний U-критерий Манна – Уитни, при сравнении трех и более независимых групп использовали H-критерий Краскела – Уоллиса. Различия между группами считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

Результаты

Определение относительного уровня мРНК FOXP3 в опухолях больных показало, что уровень мРНК детектировался не во всех исследуемых образцах. У больных РПЖ частота обнаружения составила 78.0% (49 из 63 образцов), у больных с ДГПЖ – 88.4% (46 из 52 образцов). Различия

Рис. 3. Содержание мРНК FOXP3 в опухолевой ткани больных с разным уровнем ПСА в крови

содержания мРНК FOXP3 в образцах РПЖ и ДГПЖ были статистически не значимы (рис. 1).

В подгруппе больных РПЖ с уровнем тестостерона в крови 5–15 ммоль/л количество мРНК FOXP3 в опухолевой ткани было несколько ниже по сравнению с показателями в подгруппе с уровнем тестостерона до 5 ммоль/л, однако различия были статистически не значимы. Напротив, при ДГПЖ уровень тестостерона в крови больных более 15 ммоль/л сопровождался более высоким содержанием мРНК FOXP3 в образцах опухолевой ткани (в 2.64 раза, $p = 0.0305$) по сравнению с показателем в подгруппе с уровнем тестостерона от 5 до 15 ммоль/л (рис. 2).

Высокий уровень ПСА в периферической крови больных РПЖ и ДГПЖ не сопровождался изменениями в уровне мРНК FOXP3. В сравниваемых попарно подгруппах больных РПЖ с уровнем ПСА 4–10 нг/мл и более 10 нг/мл и у больных ДГПЖ с уровнем ПСА до 4 нг/мл и от 4 до 10 нг/мл количество мРНК FOXP3 в опухолевых образцах статистически значимо не отличалось (рис. 3).

Напротив, увеличенный объем предстательной железы явился фактором, связанным с уровнем мРНК FOXP3 и у больных РПЖ, и у больных ДГПЖ. Однако у пациентов с РПЖ по мере увеличения объема железы (более 50 см³) тестируемый показатель снижался в 2.66 раза ($p = 0.0080$) в сравнении со значениями у лиц, имевших меньший объем органа (до 25 см³). В группе больных ДГПЖ наблюдалось противоположное изменение уровня мРНК FOXP3. У пациентов с объемом железы до 25 мм³ уровень мРНК FOXP3 был в 5.73 раза ниже ($p = 0.0500$), чем у больных с объемом простаты более 50 мм³ (рис. 4).

Наличие метастазов в регионарных лимфоузлах у больных РПЖ сопровождалось снижением в три раза ($p = 0.0049$) уровня мРНК FOXP3 по сравнению с альтернативной группой (рис. 5).

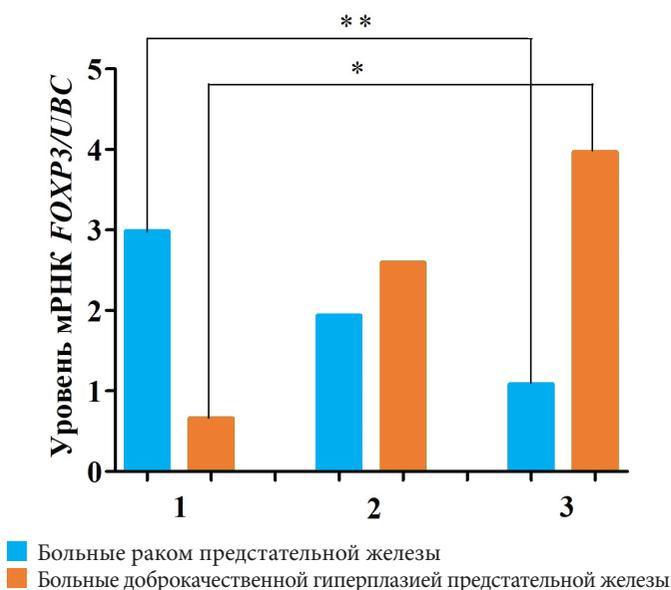


Рис. 4. Уровень мРНК FOXP3 в опухолевой ткани у больных с разным объемом железы

Примечание. 1 – объем простаты до 25 мм³, 2 – объем простаты от 25 до 50 мм³, 3 – объем простаты более 50 мм³.
 * Статистически значимое различие между группами больных доброкачественной гиперплазией простаты с объемом простаты до 25 мм³ и более 50 мм³ (p = 0.0500).
 ** Статистически значимое различие между группами больных раком предстательной железы с объемом простаты до 25 мм³ и более 50 мм³ (p = 0.0080).

Обсуждение

Ген FOXP3 расположен в центромерной области X-хромосомы (регион Xq11.3–q13.3) и содержит 12 экзонов, общая протяженность гена составляет 19 тысяч пар оснований. У людей мутации и/или варианты альтернативного сплайсинга гена FOXP3 могут быть связаны с развитием аутоиммунного полиэндокринного синдрома 3-го типа (IPEX-синдрома), к проявлениям которого относятся сахарный диабет 1-го типа, тяжелая диарея и различные формы дерматита (экзематозный, псориазоформный) [9]. Первоначально предполагалось, что экспрессия гена FOXP3 ограничена только кроветворными тканями. Однако позднее было выявлено увеличение экспрессии гена FOXP3 в эпителиальных клетках, где он действует в качестве гена – супрессора опухолевого эпителия. Показано, что зародышевые мутации FOXP3 приводят к высокой частоте спонтанного рака молочной железы и летальному аутоиммунитету у мышей. Делеции и мутации FOXP3 обнаружены в образцах рака молочной железы и предстательной железы человека. В качестве супрессора опухолевого роста FOXP3 репрессирует многие ключевые гены-мишени в развитии и прогрессировании рака, такие как HER2/ERBB2 [10], BRCA1 [11] и CD44 [12], обеспечивая прочную связь между FOXP3 и регуляцией клеточного цикла, а также FOXP3 и системой репарации ДНК. Продемонстрировано, что ось FOXP3-miR-146-NF-κB играет функциональную роль во время инициации опухоли при раке предстательной железы. Потеря FOXP3 и TSC1 ускоряет прогрессирование рака предстательной железы вследствие синергетической регуляции с-MYC [13]. Однако было показано, что FOXP3 способствует росту рака и метастазированию при немелкоклеточном раке легкого [14].

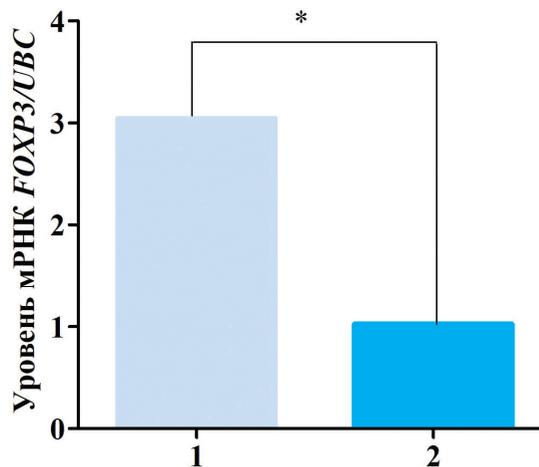


Рис. 5. Содержание мРНК FOXP3 в опухолевой ткани больных раком предстательной железы с различным состоянием периферических лимфоузлов

Примечание. 1 – группа больных, не имеющих поражения периферических лимфоузлов (n = 9), 2 – группа больных с поражением периферических лимфоузлов (n = 40).
 * Различия статистически значимы (p = 0.0049).

Ген FOXP3 кодирует белок FOXP3, который экспрессируется в опухолевых клетках и в опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах (TIL), и, по мнению некоторых авторов, связан с различиями в клинических исходах опухоли [4]. Точный механизм, с помощью которого FOXP3⁺ TIL вызывают подавление функции иммунных клеток, остается неясным. Предполагают, что это связано с продукцией ряда цитокинов, в том числе с ролью интерлейкина-10 и трансформирующего фактора роста-β [3]. В данной работе мы проанализировали изменения уровня мРНК FOXP3 в опухолевой ткани РПЖ и ДГПЖ в зависимости от ряда факторов, играющих прогностическую роль в опухолевом процессе.

Уровень мРНК FOXP3 у больных ДГПЖ статистически значимо не отличался от показателя у пациентов с РПЖ в опухоли. Заметим, что ранее сообщалось о более выраженной инфильтрации FOXP3⁺-позитивными лимфоцитарными клетками раковой опухоли по сравнению с доброкачественной тканью [15]. Как известно, иммунофенотипирование, с помощью которого были получены эти данные, позволяет определять количество положительных по какому-либо антигену клеток, но не уровень мРНК. Кроме того, различия в данных могут быть связаны с тем, что в нашем исследовании определялся суммарный уровень мРНК FOXP3, продуцируемой не только лимфоцитами, но и другими популяциями клеток, в частности клетками самой простаты.

У больных ДГПЖ уровень мРНК FOXP3 был статистически значимо выше у больных с высоким содержанием тестостерона, но не имел значимых отличий у лиц с различным уровнем ПСА. Можно предположить, что высокий уровень тестостерона на определенном этапе канцерогенеза способствует продукции мРНК FOXP3 в опухолевой ткани, поскольку сигнальный путь андрогенных рецепторов играет важную роль в нормальном развитии и гомеостазе предстательной железы, а нарушение его регуляции способно привести к развитию РПЖ. Кроме

того, известно, что андрогены обладают выраженной иммуносупрессорной функцией. Однако у больных РПЖ с более высокой концентрацией тестостерона уровень мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани не отличался от его уровня у лиц, имевших более низкую концентрацию тестостерона в крови. Изменение уровня ПСА в сыворотке крови больных РПЖ и ДГПЖ также не оказывало влияния на уровень мРНК *FOXP3*. В исследованиях других авторов также отмечена зависимость уровня мРНК *FOXP3* от стадии заболевания при РПЖ или коэффициента Глисона [13].

Возрастание уровня мРНК *FOXP3* у больных ДГПЖ с большим объемом железы, по-видимому, следует рассматривать в качестве неблагоприятного фактора прогноза, поскольку увеличение объема органа может происходить и за счет присутствия большего количества *FOXP3*⁺ Treg [9].

Напротив, у больных РПЖ отмечено снижение уровня мРНК *FOXP3* по мере увеличения объема железы. В представленных литературных исследованиях показано, что повышение экспрессии *FOXP3* может иметь разное прогностическое значение. Так, у больных HER2/неу-позитивного рака молочной железы наличие экспрессии *FOXP3* в опухолевых клетках явилось независимым фактором прогноза лучшей выживаемости пациенток после неoadъювантной химиотерапии, а в клеточных линиях гепатоцеллюлярного рака сверхэкспрессия *FOXP3* способствовала метастазированию и инвазии клеток вследствие регуляции MMP-1 [3]. Можно предположить, что повышенный уровень мРНК *FOXP3* в ткани РПЖ у больных с небольшим объемом органа направлен на локальное подавление роста опухоли и позитивно регулирует объем предстательной железы. Снижение уровня мРНК *FOXP3* у больных с большим объемом железы сопровождается не только ее повышенной инфильтрацией Treg, подавляющими иммунный ответ, но и ростом самой опухоли. Вероятно, понижение содержания мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани является одной из стратегий, используемых малигнизировавшими клетками для подавления иммунитета, уклонения от иммунного надзора, повышения метастатического потенциала малигнизированных клеток. Подтверждением этого предположения является снижение уровня мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани больных, имеющих метастазы в регионарные лимфоузлы.

Заключение

Проведенное нами исследование показало, что уровень мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани предстательной железы не отличается у больных раком и доброкачественной гиперплазией простаты. Выявлены статистически значимые изменения в экспрессии гена *FOXP3* при разных уровнях тестостерона в крови пациентов, объеме предстательной железы, а у больных РПЖ – при наличии или отсутствии поражения регионарных лимфоузлов. Уровень ПСА как у больных раком простаты, так и у больных доброкачественной гиперплазией простаты не оказывает значимого влияния на содержание мРНК *FOXP3* в ткани опухоли.

Литература

1. Ebert L.M. et al. The regulatory T-cell-associated transcription factor *FOXP3* is expressed by tumor cells // *Cancer Research*. – 2008. – V. 68. – No 8. – P. 3001–3009.
2. Hagone S. et al. Expression of *FOXP3* of tumor-infiltrating lymphocytes in invasive breast cancer:

its relationship to histopathological parameters and overall survival // *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. – 2023. – V. 31. – No 2. – P. 265–272. DOI: 10.17816/PAVLOVJ108478

3. Gong Z.Q. et al. Nuclear *FOXP3* inhibits tumor growth and induced apoptosis in hepatocellular carcinoma by targeting c-Myc // *Oncogenesis*. – 2020. – V. 9. – No 10. – P. 97.
4. Takenaka M. et al. *FOXP3* expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes is associated with breast cancer prognosis // *Molecular and Clinical Oncology*. – 2013. – V. 1 – No 4. – P. 625–632.
5. Gelişiminde F.B.P.P.K. et al. Aberrant expression of forkhead box proteins in prostate cancer development // *GMJ*. – 2020. – V. 31. – P. 460–464. DOI: 10.12996/gmj.2020.113
6. Chomczynski P. et al. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on // *Nature protocols*. – 2006. – V. 1 – No 2. – P. 581–585.
7. Pfaffl M.W. et al. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR // *Nucleic acids research*. – 2002. – V. 30. – No 9. – P. e36.
8. Новиков Д.В. и др. Корреляция экспрессии *MUC1*, *ICAM1*, *IL32*, *FCGR3A* и *FOXP3* в опухолевых очагах больных раком молочной железы // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2017. – Т. 62. – No 1. – С. 35–39. [Novikov D.V. et al. Correlation of the expression of *MUC1*, *ICAM1*, *IL32*, *FCGR3A* and *FOXP3* in tumor lesions of patients with breast cancer // *Clinical laboratory diagnostics*. – 2017. – V. 62. – No 1. – P. 35 – 39. In Russian].
9. Ramirez R.N. et al. *FOXP3* associates with enhancer-promoter loops to regulate Treg-specific gene expression // *Science Immunology*. – 2022. – V. 7. – No 67. – P. 1–17.
10. Zuo T. et al. *FOXP3* is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene // *Cell*. – 2007. – V. 129 – No 7. – P. 1275–1286.
11. Gao S. et al. MicroRNA-155, induced by *FOXP3* through transcriptional repression of *BRCA1*, is associated with tumor initiation in human breast cancer // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8 – No 25. – P. 41451–41464.
12. Sanmartín E. et al. CD44 induces *FOXP3* expression and is related with favorable outcome in breast carcinoma // *Virchows Archiv*. – 2017. – V. 470 – No 1. – P. 81–90.
13. Wu L. et al. Loss of *FOXP3* and *TSC1* accelerates prostate cancer progression through synergistic transcriptional and posttranslational regulation of c-MYC // *Cancer Research*. – 2019. – V. 79 – No 7. – P. 1413–1425.
14. Zhu J. et al. A comprehensive bioinformatics analysis of *FOXP3* in nonsmall cell lung cancer // *Medicine (Baltimore)*. – 2022. – V. 101. – No 50. – P. e32102.
15. Valdman A. et al. Distribution of *FOXP3*⁻, CD4⁺, and CD8⁺-positive lymphocytic cells in benign and malignant prostate tissue // *APMIS*. – 2010. – V. 118. – No 5. – P. 360–365.